

訂正有り
⑪特許出願公開

⑨日本国特許庁(JP)

⑫公開特許公報(A) 平2-311498

⑤Int. Cl.³C 07 K 13/00
C 12 N 1/21

識別記号

ZNA

庁内整理番号

8619-4H
6807-4B
8717-4B

⑬公開 平成2年(1990)12月27日

C 12 N 15/00 A※
審査請求 未請求 請求項の数 5 (全15頁)

⑭発明の名称 機能性ポリペプチド

⑯特 願 平1-131453

⑰出 願 平1(1989)5月26日

⑱発 明 者 田 口 由 起 滋賀県大津市瀬田3丁目4番1号 寶酒造株式会社中央研
究所内⑱発 明 者 大 館 洋 一 滋賀県大津市瀬田3丁目4番1号 寶酒造株式会社中央研
究所内⑱発 明 者 川 瀬 靖 聡 滋賀県大津市瀬田3丁目4番1号 寶酒造株式会社中央研
究所内⑱発 明 者 後 藤 晶 一 滋賀県大津市瀬田3丁目4番1号 寶酒造株式会社中央研
究所内

⑲出 願 人 寶 酒 造 株 式 会 社 京都府京都市伏見区竹中町609番地

⑳代 理 人 弁 理 士 中 本 宏 外2名

最終頁に続く

明 細 書

1. 発明の名称

機能性ポリペプチド

2. 特許請求の範囲

1. ヒトフィブロネクチンの細胞接着ドメインと、ヘパリン結合ドメインが、直接又はリンカーペプチドを介して結合していることを特徴とする機能性ポリペプチド。

2. 下記一般式I:

C₁-Met-His-His-X ... (1)

〔式中C₁は、ヒトフィブロネクチンの細胞接着ドメインのPro¹²³²-Ser¹³¹³に相当する277アミノ酸ペプチド残基を示し、下記式II:

Pro¹²³² Thr Asp Leu Arg Phe Thr Asn Ile Gly
Pro Asp Thr Met Arg Val Thr Trp Ala Pro
Pro Pro Ser Ile Asp Leu Thr Asn Phe Leu
Val Arg Tyr Ser Pro Val Lys Asn Glu Glu
Asp Val Ala Glu Leu Ser Ile Ser Pro Ser
Asp Asn Ala Val Val Leu Thr Asn Leu Leu

Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Ser Val Ser
Ser Val Tyr Glu Gln His Glu Ser Thr Pro
Leu Arg Gly Arg Gln Lys Thr Gly Leu Asp
Ser Pro Thr Gly Ile Asp Phe Ser Asp Ile
Thr Ala Asn Ser Phe Thr Val His Trp Ile
Ala Pro Arg Ala Thr Ile Thr Gly Tyr Arg
Ile Arg His His Pro Glu His Phe Ser Gly
Arg Pro Arg Glu Asp Arg Val Pro His Ser
Arg Asn Ser Ile Thr Leu Thr Asn Leu Thr
Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Ser Ile Val
Ala Leu Asn Gly Arg Glu Glu Ser Pro Leu
Leu Ile Gly Gln Gln Ser Thr Val Ser Asp
Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala
Thr Pro Thr Ser Leu Leu Ile Ser Trp Asp
Ala Pro Ala Val Thr Val Arg Tyr Tyr Arg
Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser
Pro Val Gln Glu Phe Thr Val Pro Gly Ser
Lys Ser Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys
Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr
Ala Val Thr Gly Arg Gly Asp Ser Pro Ala

Ser Ser Lys Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg
Thr Glu Ile Asp Lys Pro Ser^{1,2,3} ... (II)
で表される配列を有し、H₃はヒトフィブ
ロネクチンのヘパリン結合ドメインのAla^{1,2,3}-
Thr^{1,2,3}に相当する 271アミノ酸ペプチド残
基を示し、下記式III:

Ala^{1,2,3} Ile Pro Ala Pro Thr Asp Leu Lys Phe
Thr Glu Val Thr Pro Thr Ser Leu Ser Ala
Gln Trp Thr Pro Pro Asn Val Gln Leu Thr
Gly Tyr Arg Val Arg Val Thr Pro Lys Glu
Lys Thr Gly Pro Met Lys Glu Ile Asn Leu
Ala Pro Asp Ser Ser Ser Val Val Val Ser
Gly Leu Met Val Ala Thr Lys Tyr Glu Val
Ser Val Tyr Ala Leu Lys Asp Thr Leu Thr
Ser Arg Pro Ala Gln Gly Val Val Thr Thr
Leu Glu Asn Val Ser Pro Pro Arg Arg Ala
Arg Val Thr Asp Ala Thr Glu Thr Thr Ile
Thr Ile Ser Trp Arg Thr Lys Thr Glu Thr
Ile Thr Gly Phe Gln Val Asp Ala Val Pro
Ala Asn Gly Gln Thr Pro Ile Gln Arg Thr

Ile Lys Pro Asp Val Arg Ser Tyr Thr Ile
Thr Gly Leu Gln Pro Gly Thr Asp Tyr Lys
Ile Tyr Leu Tyr Thr Leu Asn Asp Asn Ala
Arg Ser Ser Pro Val Val Ile Asp Ala Ser
Thr Ala Ile Asp Ala Pro Ser Asn Leu Arg
Phe Leu Ala Thr Thr Pro Asn Ser Leu Leu
Val Ser Trp Gln Pro Pro Arg Ala Arg Ile
Thr Gly Tyr Ile Ile Lys Tyr Glu Lys Pro
Gly Ser Pro Pro Arg Glu Val Val Pro Arg
Pro Arg Pro Gly Val Thr Glu Ala Thr Ile
Thr Gly Leu Glu Pro Gly Thr Glu Tyr Thr
Ile Tyr Val Ile Ala Leu Lys Asn Asn Gln
Lys Ser Glu Pro Leu Ile Gly Arg Lys Lys^{1,2,3}
Thr^{1,2,3} ... (III)

で表される配列を有し、Xは下記式IV:

Asp-Glu-Leu-Pro-Gln-Leu-Val-Thr-Leu-Pro-
His-Pro-Asn-Leu-His-Gly-Pro-Glu-Ile-Leu-
Asp-Val-Pro-Ser-Thr ... (IV)

で表されるペプチド残基、あるいはその一部
又は全部が欠失した基を示し、Met はメチオ

ニン残基を示し、nは1又は零の数を示す)
で表されることを特徴とする機能性ポリペ
プチド。

- 請求項1記載の機能性ポリペプチドをコー
ドするDNAを含有せしめた組換え体プラス
ミド。
- 請求項3記載の組換え体プラスミドを導入
せしめた形質転換体。
- 請求項4記載の形質転換体を培養し、該培
養物より請求項1記載の機能性ポリペプチド
を採取することを特徴とする機能性ポリペ
プチドの製造方法。

3. 発明の詳細な説明

〔産業上の利用分野〕

本発明は、新規ポリペプチドに関し、更に詳
しくヒトフィブロネクチンの細胞接着ドメイン
ペプチドと、ヘパリン結合ドメインペプチドと
を含有する新規な機能性ポリペプチド及びその
製造方法に関する。

〔従来の技術〕

フィブロネクチン(以下FNと表示する)は、
血液や細胞外マトリックスに存在する糖タン
パク質で、多彩な機能を持つことが知られている
〔アニュアル レビュー オブ バイオケミス
トリー (Annual Review of Biochemistry)、
第57巻、第 375~413 頁(1988)〕。天然のFN
を創傷治癒、点眼薬等の医薬品や化粧品に利用
する試みがなされているが、血液から採取する
ために、供給に制限があること、コスト高であ
ること、また、病原性の細菌やウイルス等によ
る汚染の可能性があること等の理由により、実
用化されていない。また、FNの機能ドメイン
を取出して利用することも同様の理由から実用
化されていない。

〔発明が解決しようとする課題〕

FNにはヘパリンに結合する領域(ヘパリン
結合ドメイン)が2ヶ所存在し、1ヶ所はN末
端付近にあり、結合にCaイオンが必要であるこ
とが知られている。もう一方の領域はC末端附
近にあり、この領域のヘパリンに対する結合活

性は、前述の領域よりも強く、しかもCaイオンに影響されない。

最近の研究からFNのヘパリン結合ドメインが、細胞接着ドメインと同様に線維芽細胞、内皮細胞、ある種のガン細胞等の接着、伸展、移動に重要な役割を果たしていることが次第に明らかとなってきた。FNのヘパリン結合ドメインは細胞の表面にあるプロテオグリカンに結合して、細胞と細胞外マトリックスとの相互作用を引起すことにより、細胞の接着、伸展、移動等に寄与すると考えられる。したがって、細胞接着活性とヘパリン結合活性の両機能を持つポリペプチドは、細胞と細胞外マトリックスの両方に結合して創傷部の組織の修復や、恒常性の維持に寄与し、医薬品としての用途が期待できる。

本発明の目的は、FNの細胞接着活性とヘパリン結合活性の両機能を併せ持つ、新規な機能性ポリペプチド、及びその有利な製造方法を提供することにある。

〔課題を解決するための手段〕

両方の活性を有すること、更に、BHKやNRK細胞に対する細胞伸展活性が、細胞接着ドメイン単独の場合に比べて増強されていることを見出した。

以下、本発明を具体的に説明する。

ヒトFNの遺伝子構造についてはジエンボジャーナル (The EMBO Journal)、第4巻、第1755~1759頁(1985)に記載されている。また、その細胞接着ドメイン及びヘパリン結合ドメインをコードするcDNAクローン (pLP2、pLP3、pLP4及びpLP5) についてはバイオケミストリー (Biochemistry)、第25巻、第4936~4941頁(1986)に記載されている。本発明者らは、pLP5から、細胞接着ドメインに対するcDNA断片を取出し、これを発現ベクターに接続して大腸菌に導入することにより、細胞接着活性ポリペプチド及びその製造方法を開発し特許出願した (特願昭63-31820号)。本発明で必要とされる細胞接着ドメインのcDNAは、特願昭63-31820号明細書に記載されている組換え体プラスミド

本発明を概説すれば、本発明の第1の発明は、FNの細胞接着ドメインとヘパリン結合ドメインが、直接又はリンカーペプチドを介して結合していることを特徴とする新規な機能性ポリペプチドに関し、第2の発明は、前記ポリペプチドをコードするDNAを含有せしめた組換え体プラスミドに関し、第3の発明は、前記組換え体プラスミドを導入せしめた形質転換体に関し、第4の発明は、前記形質転換体を培養し、該培養物より前記ポリペプチドを採取することを中心とする新規な機能性ポリペプチドの製造方法に関する。

本発明者らは、細胞伸展活性とヘパリン結合活性を兼ね備えた新規ポリペプチドの構築及びその製造方法について研究し、ヒトFNの細胞接着ドメインとヘパリン結合ドメインが直接又はリンカーペプチドを介して結合した新規な機能性ポリペプチドを遺伝子工学的に作製した。この新規な機能性ポリペプチドの生物活性を調べた結果、細胞伸展活性とヘパリン結合活性の

pTF7021を用いることができる。pTF7021はFNのPro¹²²²-Met¹³¹¹ (279アミノ酸残基)を発現するプラスミドである。pTF7021の翻訳領域のC末端の終止コドンの直前にクローニングサイト、例えばNcoIサイトを導入することにより、細胞接着ドメインのcDNAと他のドメインのcDNAを連結させることができる。

本発明による新規な機能性ポリペプチドの具体例の1つとしては、下記一般式I:



(式中C₁₂₇₇は、ヒトFNの細胞接着ドメインのPro¹²²²-Ser¹³¹¹に相当する277アミノ酸ペプチド残基を示し、下記式II:

```

1222
Pro Thr Asp Leu Arg Phe Thr Asn Ile Gly
Pro Asp Thr Met Arg Val Thr Trp Ala Pro
Pro Pro Ser Ile Asp Leu Thr Asn Phe Leu
Val Arg Tyr Ser Pro Val Lys Asn Glu Glu
Asp Val Ala Glu Leu Ser Ile Ser Pro Ser
Asp Asn Ala Val Val Leu Thr Asn Leu Leu
Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Ser Val Ser

```

Ser Val Tyr Glu Gln His Glu Ser Thr Pro
 Leu Arg Gly Arg Gln Lys Thr Gly Leu Asp
 Ser Pro Thr Gly Ile Asp Phe Ser Asp Ile
 Thr Ala Asn Ser Phe Thr Val His Trp Ile
 Ala Pro Arg Ala Thr Ile Thr Gly Tyr Arg
 Ile Arg His His Pro Glu His Phe Ser Gly
 Arg Pro Arg Glu Asp Arg Val Pro His Ser
 Arg Asn Ser Ile Thr Leu Thr Asn Leu Thr
 Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Ser Ile Val
 Ala Leu Asn Gly Arg Glu Glu Ser Pro Leu
 Leu Ile Gly Glu Gln Ser Thr Val Ser Asp
 Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala
 Thr Pro Thr Ser Leu Leu Ile Ser Trp Asp
 Ala Pro Ala Val Thr Val Arg Tyr Tyr Arg
 Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser
 Pro Val Gln Glu Phe Thr Val Pro Gly Ser
 Lys Ser Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys
 Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr
 Ala Val Thr Gly Arg Gly Asp Ser Pro Ala
 Ser Ser Lys Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg

Ile Lys Pro Asp Val Arg Ser Tyr Thr Ile
 Thr Gly Leu Gln Pro Gly Thr Asp Tyr Lys
 Ile Tyr Leu Tyr Thr Leu Asn Asp Asn Ala
 Arg Ser Ser Pro Val Val Ile Asp Ala Ser
 Thr Ala Ile Asp Ala Pro Ser Asn Leu Arg
 Phe Leu Ala Thr Thr Pro Asn Ser Leu Leu
 Val Ser Trp Gln Pro Pro Arg Ala Arg Ile
 Thr Gly Tyr Ile Ile Lys Tyr Glu Lys Pro
 Gly Ser Pro Pro Arg Glu Val Val Pro Arg
 Pro Arg Pro Gly Val Thr Glu Ala Thr Ile
 Thr Gly Leu Glu Pro Gly Thr Glu Tyr Thr
 Ile Tyr Val Ile Ala Leu Lys Asn Asn Gln
 Lys Ser Glu Pro Leu Ile Gly Arg Lys Lys
 Thr¹⁸⁸⁸ ... (III)

で表される配列を有し、Xは下記式IV:

Asp-Glu-Leu-Pro-Gln-Leu-Val-Thr-Leu-Pro-
 His-Pro-Asn-Leu-His-Gly-Pro-Glu-Ile-Leu-
 Asp-Val-Pro-Ser-Thr ... (IV)

で表されるペプチド残基、あるいはその一部又は全部が欠失した基を示し、Metはメチオニン

Thr Glu Ile Asp Lys Pro Ser¹⁸⁸⁸ ... (II)
 で表される配列を有し、H₂₂はヒト FNのヘ
 パリン結合ドメインのAla¹⁸⁸⁸-Thr¹⁸⁸⁸に
 相当する271アミノ酸ペプチド残基を示し、下
 記式III:

Ala¹⁸⁸⁸ Ile Pro Ala Pro Thr Asp Leu Lys Phe
 Thr Gln Val Thr Pro Thr Ser Leu Ser Ala
 Gln Trp Thr Pro Pro Asn Val Gln Leu Thr
 Gly Tyr Arg Val Arg Val Thr Pro Lys Glu
 Lys Thr Gly Pro Met Lys Glu Ile Asn Leu
 Ala Pro Asp Ser Ser Ser Val Val Val Ser
 Gly Leu Met Val Ala Thr Lys Tyr Glu Val
 Ser Val Tyr Ala Leu Lys Asp Thr Leu Thr
 Ser Arg Pro Ala Gln Gly Val Val Thr Thr
 Leu Glu Asn Val Ser Pro Pro Arg Arg Ala
 Arg Val Thr Asp Ala Thr Glu Thr Thr Ile
 Thr Ile Ser Trp Arg Thr Lys Thr Glu Thr
 Ile Thr Gly Phe Gln Val Asp Ala Val Pro
 Ala Asn Gly Gln Thr Pro Ile Gln Arg Thr

残基を示し、nは1又は零の数を示す]で表さ
 れることを特徴とする機能性ポリペプチドが導
 けられる。

ヘパリン結合ドメインについてはトリプシン、
 サーマライシン、カテプシンD等によって分解
 されて得られた断片が報告されており、その大
 きさは、29kDから38kDに及んでいる。ドメイン
 の詳しい特定はなされていないが、一般的には
 約90アミノ酸から成るIII型類似配列を3個と、
 それに続くIIIcs型配列の一部を含む断片が知ら
 れている。本発明の前記式Iに記載されている
 XはIIIcs型配列の一部に相当する。ヘパリン結
 合活性にはIIIcsを必要としないが、ある種のリン
 バ系の細胞の接着には、IIIcs配列が必要とす
 る考え方もある。本発明者らはヘパリン結合ド
 メインのIII型類似配列を3個含む断片(本発明
 の前記式Iに記載されているH₂₂に相当)と、
 更にIIIcsの一部を含む断片(式IのH₂₂-X)を
 大腸菌で発現させ、ヘパリン結合活性及び細胞
 接着活性を測定した結果、両者共、ヘパリン結

合活性を有すると共に、BHK細胞に対する接合活性を有しており、更にH₂g-Xでは、接合と伸展活性が増強されていることを見出した。

ヘパリン結合ドメインをコードするcDNAは、pLP2435から取出すことができる。pLP2435は、前記pLP2、pLP3、pLP4及びpLP5から再構築されたプラスミドで、FNのヘパリン結合ドメインをコードするcDNAを含んでいる。但し、IIIcs部分に相当するcDNAは含んでいないので、Xに対応するDNA配列は化学合成によって構築する必要がある。pLP2435から必要なcDNA断片を制限酵素で切出し、5'側に開始コドンを含む合成DNAを、また、3'側には、終止コドンを含む合成DNAをDNAリガーゼで連結した後、適当な発現ベクターに接続することにより、III型類似配列が3個つらなった配列を有するペプチドを発現するプラスミドを得ることができる(第1図参照)。すなわち第1図は、H₂gを発現するプラスミドpHD101を構築するための工程図である。

れる(第3図及び第4図参照)。すなわち第3図は、C₂g-Met-H₂gを発現するプラスミドpCH101を構築するための工程図であり、第4図は、C₂g-Met-H₂gを発現するプラスミドpCH102を構築するための工程図である。

前記プラスミドにおける連結部には、HcoIサイトに由来するメチオニン残基がリンカーとして含まれる。リンカーの有無は、本発明の効果左右するものではないが、必要とあれば部位特異的変異の手法により、容易に除去することができる。

得られたプラスミドを大腸菌に導入し、適当な条件下に培養することにより、目的ペプチドが大腸菌内に蓄積される。発現の確認にはイムノブロッティングが用いられる。組換え大腸菌の全菌体タンパク質をSDS-ポリアクリルアミド電気泳動で分離した後、泳動パターンをニトロセルロース膜に移し取る。FNの細胞接着ドメインを認識するモノクローナル抗体(PN-10、宝酒造)、及びFNのヘパリンドメインを認識

このプラスミドと、IIIcsの一部(X)に対応する化学合成DNAを組合せることにより、更にIIIcsを含むペプチドを発現するプラスミドが得られる(第2図参照)。すなわち第2図は、H₂gを発現するプラスミドpHD102を構築するための工程図である。

発現ベクターとしては、既存のものはすべて利用することができるが、例えばpUC118N/pUC119N〔フェブス レターズ (FEBUS Letters)、第223巻、第174~180頁(1987)、及びその誘導体を用いることにより好結果を得ることができる。これらのプラスミドを大腸菌に導入することにより、ヘパリン結合ドメインポリペプチドを発現させ、その性質を調べるができる。次いで、これらのプラスミドからcDNA断片を取出し、前記pTF7021から誘導されたプラスミド(pTF7520)の翻訳領域の3'末端HcoIサイトに接続することにより、FNの細胞接着ドメインとヘパリン結合ドメインとが連結したポリペプチドを発現する組換え体プラスミドが得ら

するモノクローナル抗体(IST-1又はIST-2、ベーリンガー社)の両方で検出されるバンドが目的のポリペプチドである。

目的ポリペプチドの精製は、例えば次のように行う。組換え大腸菌をレーブロス等の培地に培養し、集菌した後、超音波処理により、菌体破砕液を得、これを遠心分離して上清を得る。上清を透析後、DEAEイオン交換体のカラムを通過させ、次いでCMイオン交換体及び/又はヘパリン-アガロース等のアフィニティクロマトを行う。以上の操作により、目的のポリペプチドを精製することができる。

得られたポリペプチドは、BHKやNRK細胞に対する細胞伸展活性の測定及びヘパリン結合活性の測定に用いられる。細胞伸展活性の測定は、例えばルオスラティ(Ruoslahti)らの方法〔メソッズ イン エンザイモロジー (Methods in Enzymology)、第82巻、第603~631頁(1981)〕に準じて行う。すなわち、試料をコートした後、BSAでブロッキングし

たマイクロタイタープレートに、BHK又はNRK細胞の懸濁液を添加し、37℃で約1時間インキュベートした後、未吸着の細胞を洗浄した後、ホルマリン固定して、伸展した細胞の割合を顕微鏡下に測定することにより、細胞伸展の強さを測定することができる。一方、ヘパリン結合活性は、ヘパリンを結合した粗体、例えばAP-ヘパリントヨパール(東ソー)のカラムに試料を吸着させ、NaClの塩濃度を上昇させて溶出させ、溶出された塩濃度により、ヘパリンへの結合能力を示すことができる。

以上の測定により、得られたポリペプチドが、BHKやNRK細胞に対して強い細胞伸展活性を示すと共に、ヘパリンに対しても強い親和性を示すことが証明される。

[実施例]

以下、本発明を実施例により更に具体的に説明するが、本発明はこれら実施例に限定されない。

実施例1

-SacI断片を回収した。この断片700 ngと(1-1)で得た5'側アダプター120 ngをT4 DNAリガーゼ用バッファー、0.5 mM ATP、10 mM DTT及び2.8ユニットのT4 DNAリガーゼを含む20 µlの反応液中、16℃、一夜インキュベートした。反応液を65℃、10分処理した後、NcoI及びSacIで分解し、アガロースゲル電気泳動にかけ、0.52 kbのNcoI-SacI断片約120 ngを回収した。

(1-3) SacI-BamHI断片の調製

上記プラスミドpLR2435の100 µgをEcoII 109 I及びSacIで分解し、アガロースゲル電気泳動にかけ、0.52 kbの断片を回収した。この断片を、更にBamIIで分解し、アガロースゲル電気泳動にかけ、0.27 kbのSacI-BamII断片を回収した。この断片400 ngと(1-1)で得た3'側アダプター80 ngをT4 DNAリガーゼ用バッファー、0.5 mM ATP、10 mM DTT及び2.8ユニットのT4 DNAリガーゼを含む20 µlの反応液中、16℃、一夜インキュベート

PNのヘパリン結合ドメインAla¹¹¹¹-Thr¹¹¹¹(271アミノ酸残基、以下H-271と略称する)をコードするcDNA断片のクローニング(第1図参照)

(1-1) 合成 DNAアダプターの調製

ヘパリン結合ドメインのcDNA断片をベクターに挿入するための5'側(延長63及び55、第1図参照)及び3'側(延長25及び33、第1図参照)のアダプターをアプライドバイオシステムズ社のDNA合成機を用いて合成した。各々2 µgの5'末端をリン酸化した後、アニリング操作により、2重鎖とした。

(1-2) NcoI-SacI断片の調製

PNのH-271をコードするcDNA断片を含む5.9 kbのプラスミドpLR2435 [バイオケミストリー第25巻、第4936~4941頁(1986)] 100 µgをBamHI及びSacIで分解し、アガロースゲル電気泳動にかけ、1.2 kbの断片を回収した。この断片を更にHaeIIで分解し、アガロースゲル電気泳動にかけ、0.46 kbのHaeII

した。反応液を65℃、10分処理した後、BamHI及びSacIで分解し、アガロースゲル電気泳動にかけ、0.30 kbのSacI-BamHI断片約65 ngを回収した。

(1-4) NcoI-BamHI断片の調製

(1-2)で得たNcoI-SacI断片120 ngと(1-3)で得たSacI-BamHI断片65 ngをT4 DNAリガーゼ用バッファー、0.5 mM ATP、10 mM DTT及び2.8ユニットのT4 DNAリガーゼを含む20 µlの反応液中、16℃、一夜インキュベートした。反応液を65℃、10分処理した後、BamHI及びNcoIで分解し、アガロースゲル電気泳動にかけ、0.82 kbのNcoI-BamHI断片約28 ngを回収した。

(1-5) pUC18HTの構築

分泌型発現ベクターpINIII-ompA₁ [ジエンボジャーナル、第3巻、第2437~2442頁(1984)] 1 µgをBamHI及びSalIで分解し、アガロースゲル電気泳動にかけ、lppターミネーター配列を含む0.95 kbのBamHI-SalI断

片を回収した。この断片30ngをあらかじめBamHI及びSalIで分解して脱リン酸したプラスミドpUC118N 30ngと共にT4 DNAリガーゼ用バッファー、0.5 mM ATP、10 mM DTT 及び 2.8ユニットのT4 DNAリガーゼを含む20μLの反応液中、16℃、一夜インキュベートした。反応液10μLを用いて大腸菌 HB101を形質転換し、lpp ターミナー配列をもつプラスミドを得、pUC118NTと命名した。

なお、pUC118N は、市販のpUC118ベクター〔宝活造(株)販売〕の翻訳開始コドン部位にNcoIサイトを導入し、更にリボソーム結合部位と開始コドンの距離を8塩基にしたものである。

(1-6) NcoI - BamHI 断片のpUC118NTへのクローニング

(1-5) で得たプラスミドpUC118NT 0.1μg をNcoI及びBamHIで分解後、脱リン酸した。このプラスミド20ngを(1-4) で得たNcoI - BamHI断片 20ngと共にT4 DNAリガーゼ用バ

ッファー、0.5mM ATP、10 mM DTT 及び2.8ユニットのT4 DNAリガーゼを含む20μLの反応液中、16℃、一夜インキュベートした。この反応液10μLを大腸菌 HB101の形質転換に使用した。

(1-7) 大腸菌の形質転換とプラスミドの確認

(1-6) で得た反応液10μLを用いて、大腸菌 HB101を形質転換した。得られた形質転換体中18クローンについてプラスミドの分析を行った。すなわち、ラビッド法で調製したプラスミドをBamHI及びHcoIで分解し、アガロースゲル電気泳動にかけ、予想されるHcoI - BamHI断片(0.82kb)のバンドの生成を調べた。その結果、1クローンに目的のバンドが認められた。また、ダイデオキシ法により塩基配列を決定し、目的の配列を含むことを確認した。この組換え体プラスミドをpHD101と命名した。

また、このプラスミドを保持する大腸菌HD101をEscherichia coli HB101/pHD101と表

示し、工業技術院微生物工業技術研究所に寄託した〔微工研発寄第2264号 (FBRN DP-2264)〕。

(1-8) 組換え体からのペプチドの精製

(1-7) で得たEscherichia coli HB101/pHD101を50μg/μLのアンピシリンを添加した5mLのレーブロスを含む試験管で37℃、一夜振とう培養した。これを500mLの同培養液を含む2Lの三角フラスコに接種し、100rpmで培養を続けた。660nmの吸光度が0.3の時点で2mMのIPTG(イソプロピル-β-チオガラクトシド)を添加し、20時間後に集菌した。菌体の一部を用いてイムノブロッティングを行った。すなわち、全菌体タンパク質をSDS-PAGEで分離し、泳動パターンをニトロセルロースメンブランに転写した後、FNのヘパリン結合ドメインを特異的に認識するモノクローナル抗体(1ST-1、セララブ(Sera-Lab)社販売)を作用させ、次いでパーオキシダーゼ標識第2抗体を作用させた。結合した第2抗

体のパーオキシダーゼ活性を4-クロロ-1-ナフトールと過酸化水素の存在下で発色させ、29kD付近に目的のペプチドが生産されていることを確認した。次に、全菌体ペレットを20mM K₂HPO₄ (pH 7.0)、1mM EDTA、5mM メルトカプトエタノール、3μM パラアミジノフェニルメタンスルホンフルオリド

(p-APMSF)を含む溶液に懸濁して、超音波処理を行った。12000 rpmで20分遠心して、上清25mLを得た。これを、20mM K₂HPO₄ (pH 7.0)バッファーで平衡化したCM-トヨパール 650Mのカラム(15mL)に通した。同一バッファーで非吸着画分を除いた後、0.15M NaClを含む20mM K₂HPO₄ (pH 7.0)バッファーで溶出し、分画した。溶出液のイムノブロッティングを行い、目的画分を集めた。次にこの画分を0.15M NaClを含む20mM K₂HPO₄ (pH 7.0)バッファーで平衡化したヘパリン-トヨパール 650Mのカラム(80mL)に通した。カラムを0.2M NaClを含む20mM K₂HPO₄ (pH

7.0)バッファーで洗浄後、20 mM K₂HPO₄ (pH 7.0)バッファー中、0.2 M NaCl から0.45M NaCl の直線濃度勾配による溶出を行い、分離した。イムノブロッティングにより目的画分を集め、脱塩、凍結乾燥して、電気泳動的にはほぼ単一なペプチド約20mgを得た。ABI社のペプチドシーケンサー477A/120Aを用いて、本ペプチドのN末端からのアミノ酸配列を調べたところ、Ala-Ile-Pro-Ala-Pro-Thr-Asp-Leuの配列が認められ、目的のペプチドのN末端配列と一致した。また、カルボキシペプチダーゼP(宝酒造)消化法により、C末端はThrであることが確認された。

実施例2

FNのⅢcs領域の一部(Asp¹²⁵¹-Thr¹²⁵⁵、25アミノ酸残基)を含むヘパリン結合ドメイン(Ala¹²⁵⁰-Thr¹²⁵⁵、296アミノ残基、以下H-296と略称する)をコードするcDNA断片のクローニング(第2図参照)

(2-1) BamII - BamHI断片の調製

490 ngをT4 DNAリガーゼ用バッファー、0.5mM ATP、10mM DTT及び2.8ユニットのT4 DNAリガーゼを含む20μlの反応液中、16℃、一夜インキュベートした。反応液を65℃、10分処理した後、BamHI及びSacIで分解し、アガロースゲル電気泳動にかけ、0.38kbのSacI - BamHI断片約100ngを回収した。

(2-3) pHD101の SacI - BamHI断片(ベクター断片)の調製

H-271をコードするプラスミドpHD101の1μgをSacI及びBamHIで分解し、脱リン酸した後、アガロースゲル電気泳動にかけ、4.5kbのSacI - BamHIベクター断片約280ngを回収した。

(2-4) SacI - BamHI断片とベクターの結合

(2-2)で得た0.38kbのSacI - BamHI断片50ngと、(2-3)で得た4.5kbのSacI + BamHIベクター断片20ngをT4 DNAリガーゼ用バッファー、0.5mM ATP、10mM DTT及び2.8ユニットのT4 DNAリガーゼを含む20μlの反応液中、

FNのⅢcsのCS領域(ジャーナル オブ セル バイオロジー(J. Cell Bio.)第103巻、第2637~2647頁(1986))をコードするDNA断片を含む合成DNA(鎖長77及び78、第2図参照)をアプライドバイオシステムズ社のDNA合成機を用いて合成した。各々2μgの5'末端をリン酸化した後、アニーリング操作により、相補的な配列部分を2重鎖とした。このDNAを7mMトリス(Tris)-HCl(pH 7.5)、0.1mM EDTA、20mM NaCl、7mM MgCl₂、0.1mM dATP、dGTP、dCTP、dTTP及び2ユニットのクレノウ酵素を含む100μlの反応液中、37℃、30分インキュベートした。70℃、5分で反応を停止した後、BamHI及びBamIIで分解し、アガロースゲル電気泳動にかけ、0.11kbのBamII - BamHI断片約400ngを回収した。

(2-2) SacI - BamHI断片の調製

(2-1)で得たBamII - BamHI断片200ngと、(1-3)で得た0.27kbのSacI - BamII断片

16℃、一夜インキュベートした。この反応液10μlを大腸菌HD101の形質転換に使用した。

(2-5) 大腸菌の形質転換とプラスミドの確認

(2-4)で得た反応液10μlを用いて大腸菌HB101を形質転換した。得られた形質転換体中12クローンについてプラスミドの分析を行った。すなわち、ラビット法で調製したプラスミドをBamHI及びNcoIで分解し、アガロースゲル電気泳動にかけ、予想されるNcoI - BamHI断片(0.9kb)のバンドの生成を調べた。その結果、1クローンに目的のバンドが認められた。また、ダイデオキシ法により塩基配列を決定し、目的の配列を含むことを確認した。この組換え体プラスミドをpHD102と命名した。

また、このプラスミドを保持する大腸菌HB101をEscherichia coli HD101/pHD102と表示し、工業技術院微生物工業技術研究所に寄託した(微工研菌寄第10721号(PBRM P-10721))。

(2-6) 組換え体からのペプチドの精製

(2-5)で得た *Bscherichia coli* HD101/pHD102 を、(1-8)と同様の方法で培養、精製し、500 mlの培養液から電気泳動的にほぼ単一のペプチド約5 mgを得た。ABI社のペプチドシーケンサー477A/120Aを用いて、本ペプチドのN末端からのアミノ酸配列を調べたところ、目的のペプチドのN末端配列と一致した。また、カルボキシペプチダーゼP消化法により、C末端はThrであることが確認された。

実施例3

FNの細胞接着ドメインPro¹²³²-Ser¹⁵¹⁵

(277アミノ酸残基)とH-271との融合タンパク質をコードするcDNA断片のクローニング(第3図参照)

(3-1) 細胞接着ドメインPro¹²³²-Ser¹⁵¹⁵ (277アミノ酸残基)をコードするプラスミドの構築

特願昭63-31820号明細書に記載されている組換え体プラスミドpTF7021の翻訳領域の

(3-1)で得たプラスミドpTF7520をNcoI及びHincIIで分解後、脱リン酸した。このプラスミド50ngを(1-2)で得たNcoI-HincII断片50ngと共にT4 DNAリガーゼ用バッファー、0.5mM ATP、10mM DTT及び2.8ユニットのT4 DNAリガーゼを含む20μlの反応液中、16℃、一夜インキュベートした。この反応液10μlを用いて大腸菌HB101を形質転換し、FNの細胞接着ドメインPro¹²³²-Ser¹⁵¹⁵ (277アミノ酸残基)とH-271がMetを介して結合した融合タンパク質(C₂₇₇-Met-H₂₇₁)を発現するプラスミドを得、pCH101と命名した。

また、このプラスミドを保持する大腸菌HB101を*Bscherichia coli* HD101/pCH101と表示し、工業技術院微生物工業技術研究所に寄託した〔微工研菌寄第10722号(FERM P-10722)〕。

(3-4) pCH101からの介在配列(ATG)の除去

(3-3)で得たプラスミドpCH101によって発現される融合タンパク質(C₂₇₇-Met-H₂₇₁)

終止コドンの直前に部位特異的変異の手法により、NcoIサイトを導入したプラスミドを構築した。pTF7021へのNcoIサイトの導入は、オリゴヌクレオチドd(pCTATTACACCATGGATGGTTT)を合成し、サイトダイレクテッドミュータジェネシスシステムミュータン-K (Site-directed mutagenesis system Mutan-K) (宝酒造(株)販売)を用いて行った。このNcoIサイトの導入に伴い細胞接着ドメインのC末端のGln¹⁵¹⁵-Met¹⁵¹⁷はMet¹⁵¹⁵-Val¹⁵¹⁷に置き換わっている(第3図参照)。得られたプラスミドをpTF7520と命名した。

(3-2) pHD101のNcoI-HincII断片の調製

(1-7)で得た組換え体プラスミドpHD101の1μgをNcoI及びHincIIで分解し、アガロースゲル電気泳動にかけ、1.77kbのNcoI-HincII断片約100ngを回収した。

(3-3) pHD101のNcoI-HincII断片のpTF7520へのクローニング

の細胞接着ドメインPro¹²³²-Ser¹⁵¹⁵ (277アミノ酸残基)とH-271の間にはMetが付加されている。このMetに対応する配列(ATG)を部位特異的変異の手法により除去した。pCH101からの介在配列(ATG)の除去は、オリゴヌクレオチドd(pAGGAATAGCGGATGGTTT)を合成し、サイトダイレクテッドミュータジェネシスシステムミュータン-K (宝酒造(株)販売)を用いて行った。その結果、細胞接着ドメインPro¹²³²-Ser¹⁵¹⁵ (277アミノ酸残基)とH-271が直接結合した融合タンパク質(C₂₇₇-H₂₇₁)を発現するプラスミドを得、pCH201と命名した。

(3-5) 組換え体からのペプチドの精製

(3-3)で得た*Bscherichia coli* HD101/pCH101を(1-8)と同様の方法で培養し、500 mlの培養液から抽出液を得た。FNの細胞接着ドメインを認識するモノクローナル抗体(FN-10、宝酒造)及び前記モノクローナル抗体1ST-1の両方に反応する面分を(1-8)と

同様の方法で精製して15mgの精製品を得た。本ペプチドのN末端配列は目的ペプチドの配列と一致した。また、カルボキシペプチダーゼP消化法により、C末端はThrであることを確認した。

実施例4

FNの細胞接着ドメインPro¹²³⁴-Ser¹⁵¹⁵ (277アミノ酸残基)とH-296との融合タンパク質をコードするcDNA断片のクローニング(第4図参照)

(4-1) pHD102の NcoI - HincII 断片の調製

(2-5) で得られた組換え体プラスミドpHD102の1μgをNcoI及びHincIIで分解し、アガロースゲル電気泳動にかけ、1.84kbのNcoI - HincII断片約100ngを回収した。

(4-2) pHD102の NcoI - HincII 断片のpTF7520へのクローニング

(3-1) で得たプラスミドpTF7520をNcoI及びHincIIで分解後、脱リン酸した。このプラスミド50ngを(4-1) で得た NcoI-HincII

除去を(3-4)と同様の方法で行った。その結果、細胞接着ドメインPro¹²³⁴-Ser¹⁵¹⁵ (277アミノ酸残基)とH-296が直接結合した融合タンパク質(C₂₉₆-H₂₉₆)を発現するプラスミドを得、pCH202と命名した。

(4-4) 組換え体からのペプチドの精製

(4-2) で得たEscherichia coli HD101/pCH102を(3-5)と同様の方法で培養、精製し、500μlの培養液から、電気泳動的にほぼ単一なペプチド約6mgを得た。N末端配列分析及びC末端分析の結果は目的ペプチドのものと一致した。

実施例5 生物活性の測定

前記実施例1~4で得られた各ポリペプチドを用いて細胞接着活性及びヘパリン結合活性を測定した。

細胞接着活性は、ルオスラティらの方法(メソッズ イン エンザイモロジー、第82巻、第803~831頁(1981))に準じて測定した。試料を蒸留水、PBS(リン酸緩衝生理食塩水)

断片50ngと共にT4 DNAリガーゼ用バッファー、0.5mM ATP、10mM DTT及び28ユニットのT4 DNAリガーゼを含む20μlの反応液中、16℃、一夜インキュベートした。この反応液10μlを用いて大腸菌HD101を形質転換し、FNの細胞接着ドメインPro¹²³⁴-Ser¹⁵¹⁵ (277アミノ酸残基)とH-296がMetを介して結合した融合タンパク質(C₂₉₆-Met-H₂₉₆)を発現するプラスミドを得、pCH102と命名した。

また、このプラスミドを保持する大腸菌HD101をEscherichia coli HD101/pCH102と表示し、工業技術院微生物工業技術研究所に寄託した[微工研菌寄第10723号(FBRM P-10723)]。

(4-3) pCH102からの介在配列(ATG)の除去

(4-2) で得たプラスミドpCH102によって発現される融合タンパク質(C₂₉₆-Met-H₂₉₆)の細胞接着ドメインPro¹²³⁴-Ser¹⁵¹⁵ (277アミノ酸残基)とH-296の間にはMetが付加されている。このMetに対応する配列(ATG)の

等に加し、96穴マイクロプレート上で段階的に希釈した。4℃、2時間インキュベートして、試料をプレート上に吸着させた(50μl/ウェル)。3%BSA(牛血清アルブミン)を含むPBS溶液を100μl/ウェル加え、37℃、1時間インキュベートしてプレートをブロックした。PBSでプレートを洗浄後、あらかじめダルベッコ(Dulbecco's)イーグル最小栄養培地(DMEM)に5×10⁵細胞/mlとなるように懸濁させたベビーハムスター腎細胞(BHK-21)を100μl/ウェル分注し、37℃、1時間インキュベートした。なお使用したBHK-21細胞は、凍結保存した株を継代培養後、トリブシン処理(37℃、5分)したものを用いた。PBSでプレートを洗浄後、3%ホルマリン溶液で細胞をプレート上に固定した。

顕微鏡下でBHK-21細胞の伸展を観察し、伸展細胞数が、n-FNの高濃度における伸展細胞数の50%となる試料の濃度(ED₅₀)を求め細胞接着活性の指標とした。

ヘパリン結合活性の測定は以下のようにした。
20 mM リン酸バッファー (pH 7.0) で平衡化したAFヘパリンートヨパール 650Mのカラム (1.5ml) に試料を乗せ、バッファー中のNaCl濃度を段階的に上昇させ、溶出される塩濃度によりヘパリンへの結合力を表した。

以上の方法で各試料の生物活性を測定した結果を第1表に示す。

第 1 表

試 料	細胞伸展活性 ED ₅₀ (nmol/ml)	ヘパリン結合活性 (溶出塩濃度、mM)
H-271	なし	300
H-296	41	300
C ₂₇₁ -Met-H ₂₇₁	0.176	300
C ₂₇₁ -Met-H ₂₉₆	0.084	300

〔発明の効果〕

以上述べてきたごとく、本発明により、細胞接着活性とヘパリン結合活性の両活性を合せ持つ新規ポリペプチド及びその製造法が提供される。このポリペプチドは細胞とヘパリン硫酸な

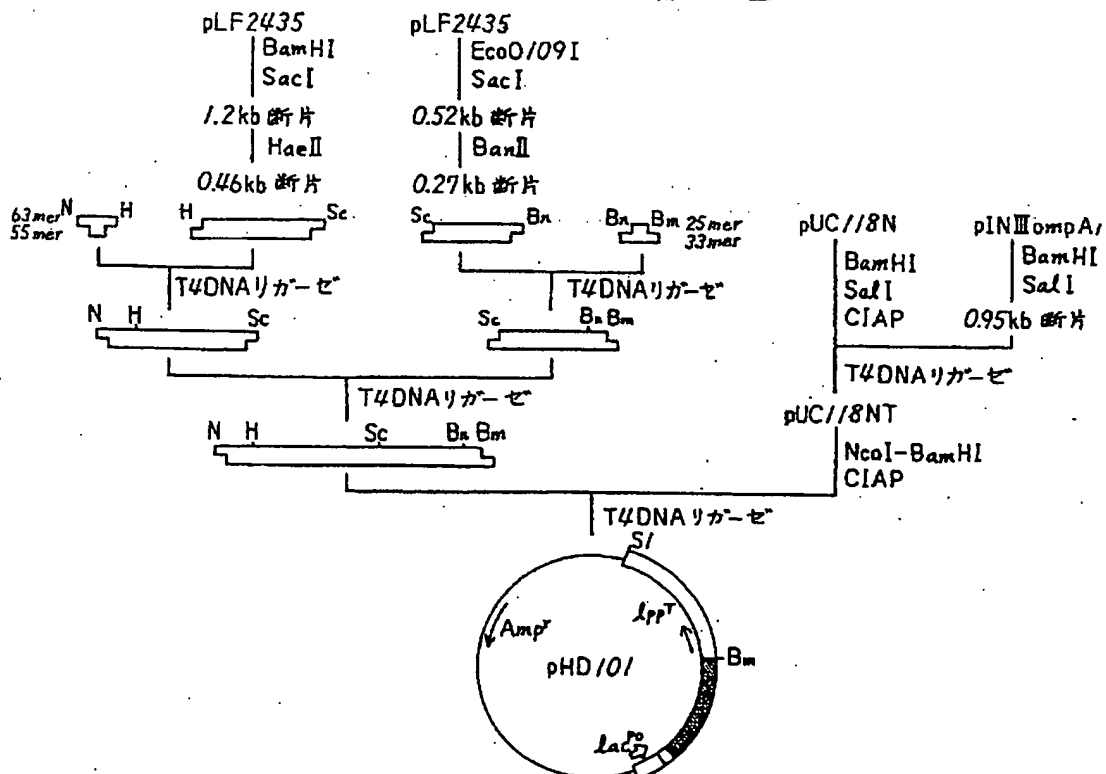
どの細胞外マトリックスとの結合の仲立ちをし、創傷治癒等に役立つ有用なタンパク質である。

4. 図面の簡単な説明

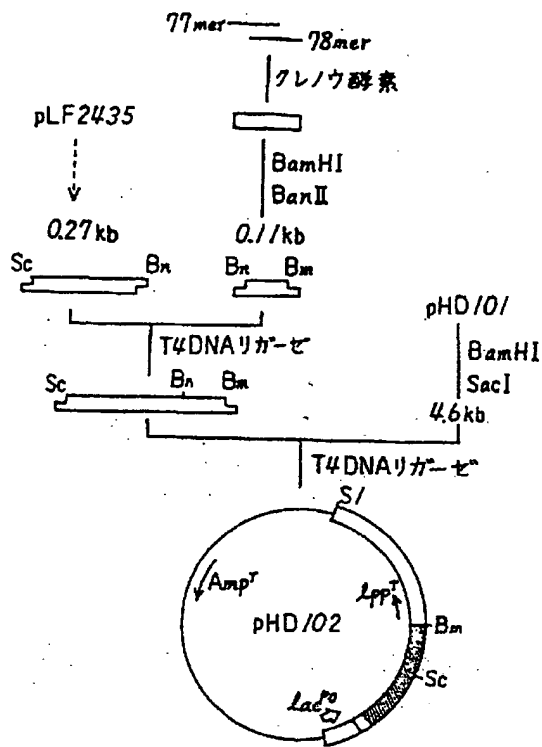
第1図はH-271を発現するプラスミドpHD101を構築するための工程図、第2図はH-296を発現するプラスミドpHD102を構築するための工程図、第3図はC₂₇₁-Met-H₂₇₁を発現するプラスミドpCH101を構築するための工程図、第4図はC₂₇₁-Met-H₂₉₆を発現するプラスミドpCH102を構築するための工程図である。

特許出願人 資 酒 造 株 式 会 社
代 理 人 中 本 宏
同 井 上 昭
同 吉 嶺 桂

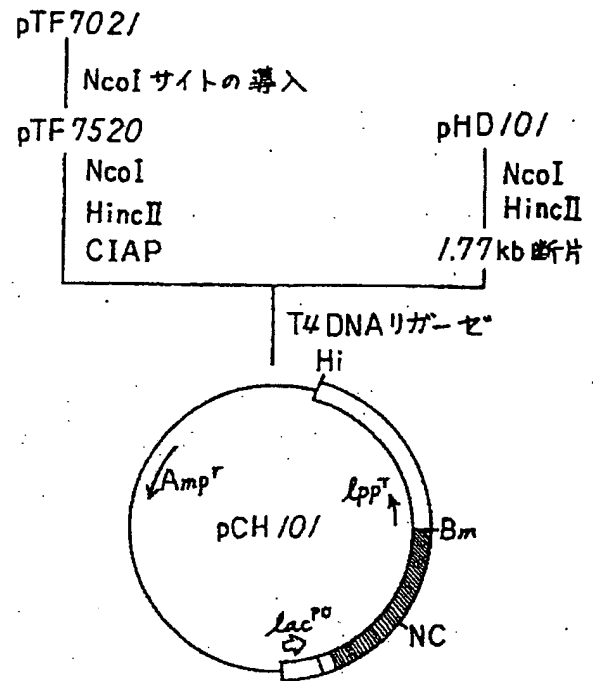
第 1 図



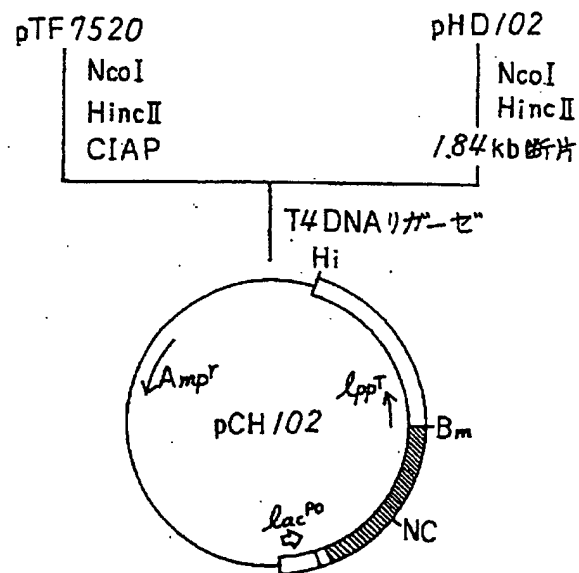
第 2 図



第 3 図



第 4 図



第1頁の続き

⑤Int. Cl.¹

識別記号

庁内整理番号

C 12 N 15/62
 15/70
 C 12 P 21/02
 // A 61 K 37/02
 (C 12 N 1/21
 C 12 R 1:19)
 (C 12 P 21/02
 C 12 R 1:19)

C 8214-4B
 8615-4C

⑥発明者 君塚 房夫 滋賀県大津市瀬田3丁目4番1号 寶酒造株式会社中央研
 究所内

⑦発明者 加藤 郁之進 滋賀県大津市瀬田3丁目4番1号 寶酒造株式会社中央研
 究所内

手続補正書 (自発)

平成1年7月4日

特許庁長官 吉田文毅殿

1. 事件の表示 平成1年特許願第131453号

2. 発明の名称 機能性ポリペプチド

3. 補正をする者

事件との関係 特許出願人

住 所 京都府京都市伏見区竹中町609番地

名 称 寶酒造株式会社

代表者 田辺 哲

4. 代理人

〒105
 住 所 東京都港区西新橋3丁目15番8号
 西新橋中央ビル302号 電話(437)3467

氏 名 弁理士(7850) 中 本 宏

(ほか2名)

5. 補正命令の日付 自発補正

6. 補正の対象

(1) 明細書の発明の詳細な説明の欄

7. 補正の内容

明細書の発明の詳細な説明の欄を下記のとおり補正する。

- (1) 明細書第18頁1～2行の「(IST・・・がー社)」を下記のとおり補正する。
 「(IST-1又はIST-2、セラ-ラブ(Sera-Lab)社販売)」
- (2) 同第25頁下から3～2行の「(IST-1・・・販売)」を下記のとおり補正する。
 「(IST-1、セラ-ラブ社販売)」
- (3) 同第29頁下から4行の「Sac(+BamHI)」を「SacI-BamHI」と補正する。
- (4) 同第30頁下から4行の「Escherihia」を「Escherichia」と補正する。

方式 査 閱

手続補正書 (自発)

平成2年4月12日

特許庁長官 吉田文毅殿

1. 事件の表示 平成1年特許願第131453号

2. 発明の名称 機能性ポリペプチド

3. 補正をする者

事件との関係 特許出願人

住所 京都府京都市伏見区竹中町609番地

名称 寶酒造株式会社

代表者 田辺哲

4. 代理人

〒105 東京都港区西新橋3丁目15番8号

西新橋中央ビル302号 電話(437)3467

氏名 弁理士(7850) 中本 宏

(ほか2名)

5. 補正命令の日付 自発補正

6. 補正の対象

(1) 明細書の発明の詳細な説明の欄

7. 補正の内容

明細書の発明の詳細な説明の欄を下記のとおり補正する。

(1) 明細書第33頁下から5～4行の「寄託・
・・2) 」。」なる全文を下記のとおり補正する。

「寄託した〔微工研発寄第2799号 (FERM BP
- 2799) 〕。』」

(2) 同第36頁下から8～7行の「託し・
・・3) 」。」なる全文を下記のとおり補正する。

「託した〔微工研発寄第2800号 (FERM BP -
2800) 〕。』」

受託番号変更届

平成2年4月12日

特許庁長官 吉田文毅殿

1. 事件の表示 平成1年特許願第131453号

2. 発明の名称 機能性ポリペプチド

3. 手続をした者

事件との関係 特許出願人

住所 京都府京都市伏見区竹中町609番地

名称 寶酒造株式会社

代表者 田辺哲

4. 代理人

〒105 東京都港区西新橋3丁目15番8号

西新橋中央ビル302号

電話(437)3467

氏名 弁理士(7850) 中本 宏

(ほか2名)

6. 旧受託番号

微工研発寄第10722号

7. 新寄託機関の名称

工業技術院微生物工業技術研究所

8. 新受託番号

微工研発寄第2799号

9. 添付書類の目録

(1) 新受託番号を証明する書面 1通

5. 旧寄託機関の名称

工業技術院微生物工業技術研究所

受託番号変更届

平成2年4月12日

特許庁長官 吉田 文 毅 殿

1. 事件の表示 平成1年特許願第131453号

2. 発明の名称 機能性ポリペプチド

3. 手続をした者

事件との関係 特許出願人

住 所 京都府京都市伏見区竹中町609番地

名 称 實 業 造 株 式 会 社

代表者 田 辺 哲

4. 代 理 人

住 所 西105
東京都港区西新橋3丁目15番8号

西新橋中央ビル302号

電話(437)3467

氏 名 弁理士(7850) 中 本 宏

(ほか2名)



5. 旧寄託機関の名称

工業技術院微生物工業技術研究所

6. 旧受託番号

微工研菌寄第10723号

7. 新寄託機関の名称

工業技術院微生物工業技術研究所

8. 新受託番号

微工研菌寄第2800号

9. 添付書類の目録

(1) 新受託番号を証明する書面 1通

2.4.12

【公報種別】特許法第17条の2の規定による補正の掲載

【部門区分】第3部門第2区分

【発行日】平成6年(1994)12月6日

【公開番号】特開平2-311498

【公開日】平成2年(1990)12月27日

【年通号数】公開特許公報2-3115

【出願番号】特願平1-131453

【国際特許分類第5版】

C07K 13/00 ZNA 8318-4H

C12N 1/21 7236-4B

15/62

15/70

C12P 21/02 C 8214-4B

// A61K 37/02 8314-4C

(C12N 1/21

C12R 1:19)

(C12P 21/02

C12R 1:19)

【FI】

C12N 15/00 A 9050-4B

手続補正書(自発)

平成6年6月30日

特許庁長官 森 生 敬 啟

1. 事件の表示 平成1年特許願第131453号

2. 発明の名称 機能性ポリペプチド

3. 補正をする者

事件との関係 特許出願人

住 所 京都府京都市伏見区竹中町809番地

名 称 西 崎 造 株式会社

代表者 大 宮 久

(代型者変更)

4. 代 理 人

〒105

住 所 東京都港区西新橋3丁目15番8号

西新橋中央ビル302号 電話(3437)3467番

氏 名 非理士(7850) 中 本 安

(ほか2名)

5. 補正命令の日付 自発補正

6. 補正により増加する請求項の数 1

7. 補正の対象

(1) 明細書の特許請求の範囲の図

(2) 明細書の発明の詳細な説明の図

8. 補正の内容

(1) 明細書の特許請求の範囲の図を別紙のとおり補正する。

(2) 明細書の発明の詳細な説明の図を下記のとおり補正する。

ア. 明細書第5頁下から3行の「を含有・・・その」なる全文

を下記のとおり補正する。

「を含有する新規な機能性ポリペプチド、並びにそれらをコードする遺伝子、及びその遺伝子を用いた遺伝子工学的な」イ. 同第8頁5～8行の「ブチド・・・該増」なる全文を下記のとおり補正する。

「ブチドに関し、第2の発明は、第1の発明の新規な機能性ポリペプチドをコードする遺伝子に関する。本発明の第3の発明は、前記ポリペプチドをコードする遺伝子を含有せしめた組換え体プラスミドに関し、また第4の発明は、前記組換え体プラスミドを導入せしめた形質転換体に関し、更に第5の発明は、前記形質転換体を培養し、該増」

ウ. 同第3頁下から2行の「つ新・・・され」なる全文を下記のとおり補正する。

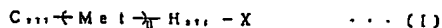
「つ新規ポリペプチド、並びにそれらをコードする遺伝子、及びその遺伝子を用いた遺伝子工学的な製造方法が提供され」



2 特許請求の範囲

1. ヒトフィブロネクチンの細胞接着ドメインと、ヘパリン結合ドメインが、直接又はリンカーペプチドを介して結合していることを特徴とする機能性ポリペプチド。

2 下記一般式 I :



(式中C₁₋₇₇は、ヒトフィブロネクチンの細胞接着ドメインのPro¹⁻¹³³-Ser¹³³に相当する277アミノ酸ペプチド残基を示し、下記式II :

Pro¹⁻²⁷⁷ Thr Asp Leu Arg Phe Thr Asn Ile Gly
Pro Asp Thr Met Arg Val Thr Trp Ala Pro
Pro Pro Ser Ile Asp Leu Thr Asn Phe Leu
Val Arg Tyr Ser Pro Val Lys Asn Glu Glu
Asp Val Ala Glu Leu Ser Ile Ser Pro Ser
Asp Asn Ala Val Val Leu Thr Asn Leu Leu
Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Ser Val Ser
Ser Val Tyr Glu Glu His Glu Ser Thr Pro
Leu Arg Gly Arg Glu Lys Thr Gly Leu Asp
Ser Pro Thr Gly Ile Asp Phe Ser Asp Ile
Thr Ala Asn Ser Phe Thr Val His Trp Ile
Ala Pro Arg Ala Thr Ile Thr Gly Tyr Arg
Ile Arg His His Pro Glu His Phe Ser Gly
Arg Pro Arg Glu Asp Arg Val Pro His Ser
Arg Asn Ser Ile Thr Leu Thr Asn Leu Thr
Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Ser Ile Val
Ala Leu Asn Gly Arg Glu Glu Ser Pro Leu
Leu Ile Gly Glu Glu Ser Thr Val Ser Asp

Ile Lys Pro Asp Val Arg Ser Tyr Thr Ile
Thr Gly Leu Glu Pro Gly Thr Asp Tyr Lys
Ile Tyr Leu Tyr Thr Leu Asn Asp Asn Ala
Arg Ser Ser Pro Val Val Ile Asn Ala Ser
Thr Ala Ile Asn Ala Pro Ser Asn Leu Arg
Phe Leu Ala Thr Thr Pro Asn Ser Leu Leu
Val Ser Trp Glu Pro Pro Arg Ala Arg Ile
Thr Gly Tyr Ile Ile Lys Tyr Glu Lys Pro
Gly Ser Pro Pro Arg Glu Val Val Pro Arg
Pro Arg Pro Gly Val Thr Glu Ala Thr Ile
Thr Gly Leu Glu Pro Gly Thr Glu Tyr Thr
Ile Tyr Val Ile Ala Leu Lys Asn Asn Glu
Lys Ser Glu Pro Leu Ile Gly Arg Lys Lys
Thr¹³³ ... (II)

で表される配列を有し、Xは下記式IV :

Asp-Glu-Leu-Pro-Glu-Leu-Val-Thr-Leu-Pro-
His-Pro-Asn-Leu-His-Gly-Pro-Glu-Ile-Leu-
Asp-Val-Pro-Ser-Thr ... (IV)

で表されるペプチド残基、あるいはその一部又は全部が欠失した基を示し、Metはメチオニン残基を示し、nは1又は零の数(を示す)で表されることを特徴とする機能性ポリペプチド。

3. 請求項1記載の機能性ポリペプチドをコードする遺伝子。
4. 請求項3記載の機能性ポリペプチドをコードする遺伝子を含有せしめた組換え体プラスミド。
5. 請求項4記載の組換え体プラスミドを導入せしめた形質転換体。
6. 請求項5記載の形質転換体を培養し、栽培動物より請求項1

Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala
Thr Pro Thr Ser Leu Leu Ile Ser Trp Asp
Ala Pro Ala Val Thr Val Arg Tyr Tyr Arg
Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser
Pro Val Glu Glu Phe Thr Val Pro Gly Ser
Lys Ser Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys
Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr
Ala Val Thr Gly Arg Gly Asp Ser Pro Ala
Ser Ser Lys Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg
Thr Glu Ile Asp Lys Pro Ser¹³³ ... (II)

で表される配列を有し、H₁₋₂₇はヒトフィブロネクチンのヘパリン結合ドメインのAla¹⁻¹³³-Thr¹³³に相当する271アミノ酸ペプチド残基を示し、下記式III :

Ala¹⁻²⁷¹ Ile Pro Ala Pro Thr Asp Leu Lys Phe
Thr Glu Val Thr Pro Thr Ser Leu Ser Ala
Glu Trp Thr Pro Pro Asn Val Glu Leu Thr
Gly Tyr Arg Val Arg Val Thr Pro Lys Glu
Lys Thr Gly Pro Met Lys Glu Ile Asn Leu
Ala Pro Asp Ser Ser Ser Val Val Val Ser
Gly Leu Met Val Ala Thr Lys Tyr Glu Val
Ser Val Tyr Ala Leu Lys Asp Thr Leu Thr
Ser Arg Pro Ala Glu Gly Val Val Thr Thr
Leu Glu Asn Val Ser Pro Pro Arg Arg Ala
Arg Val Thr Asp Ala Thr Glu Thr Thr Ile
Thr Ile Ser Trp Arg Thr Lys Thr Glu Thr
Ile Thr Gly Phe Glu Val Asp Ala Val Pro
Ala Asn Gly Glu Thr Pro Ile Glu Arg Thr

記載の機能性ポリペプチドを採取することを特徴とする機能性ポリペプチドの製造方法。

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.